

Wpływ spożycia alkoholu etylowego na parametry obrony antyoksydacyjnej w wątrobie szczurów Wistar

Influence of ethanol intake on hepatic antioxidant defense parameters in male Wistar rats

Aleksandra Kołota, Marta Rawa, Katarzyna Dziendzikowska,
Michał Oczkowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska

Katedra Dietetyki, Zakład Fizjologii Żywienia, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Abstract – Introduction. Chronic ethanol intake may cause many negative health consequences. Oxidative stress is associated with the imbalance between intracellular production of reactive oxygen species and their elimination by the biological system.

The aim of the presented study was to examine the influence of ethanol intake on chosen antioxidative parameters in liver homogenates of young male Wistar rats, which served as an animal model of alcohol drinking among adolescents.

Material and method. The object of the study were 25 young Wistar male rats. The animals were divided into 4 groups: 2 experimental groups (E2 and E6) and 2 control groups (C2 and C6). The intake of the experimental groups was a 10% ethanol solution since the 30th day of life, during 2 and 6 weeks periods respectively. The control groups were drinking water *ad libitum*. Experimental groups were drinking only alcohol during the dark cycle, and during the day, also water *ad libitum*. After a period of 2 and 6 weeks the rats were anesthetized and their livers were collected. The activity of glutathione reductase (GR) and the level of total antioxidant status (TAS) in the liver homogenates were determined spectrophotometrically using test kits.

Results. During two weeks of experiment the average daily ethanol intake was 6 ± 1 g/kg body weight, whereas in animals receiving 10% ethanol solution for six weeks, average daily ethanol intake was 5 ± 1 g/kg of body weight. The statistical analysis revealed no significant effect of 2 and 6 weeks of ethanol consumption on TAS concentration in the liver of the rats. Simultaneously, a significant decrease of GR activity after 2 weeks, but not after 6 weeks, of 10% ethanol solution intake and no change in activity after 6 weeks was observed. Over a shorter period of alcohol consumption the antioxidant defense mechanisms in the liver were disturbed.

Key words: ethanol, reactive oxygen species (ROS), total antioxidant status (TAS), glutathione reductase (GR), Wistar rats

Streszczenie – Wprowadzenie. Długotrwałe spożywanie nadmiernych ilości alkoholu prowadzi do występowania szeregu niekorzystnych efektów zdrowotnych. Metabolizm etanolu zakłóca obronę antyoksydacyjną w organizmie m.in. poprzez wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu (RFT). Stres oksydacyjny jest związany z zaburzeniem równowagi między produkcją i aktywnością reaktywnych form tlenu a mechanizmami obronnymi organizmu odpowiedzialnymi za ich eliminację.

Badania finansowane w ramach projektu badawczego MNiSW nr N N 312 158334

Celem pracy było określenie wpływu spożywania alkoholu etylowego na poziom wybranych parametrów obrony antyoksydacyjnej w wątrobie młodych samców Wistar, które były modelem spożywania alkoholu przez dorastającą młodzież.

Materiał i metoda. Badanie przeprowadzono na 25 młodych samcach szczurów Wistar, które podzielono na 4 grupy: 2 grupy badawcze (E2 i E6) i 2 grupy kontrolne (K2 i K6). Szczury z grup badawczych od 30. dnia życia spożywały w fazie nocnej przez 2 lub 6 tygodni 10% roztwór alkoholu etylowego w fazie nocnej, natomiast w ciągu dnia otrzymywały w drugim poidelku wodę *ad libitum*. Po 2 lub 6 tygodniach doświadczenia szczury usypiano i w narkozie pobierano wątroby. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) i poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAS) w homogenatach wątroby oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu gotowych zestawów testowych.

Wyniki. W czasie dwóch tygodni trwania doświadczenia średnie dzienne spożycie etanolu w przeliczeniu na kg masy ciała wyniosło 6 ± 1 g, natomiast u zwierząt, którym podawano 10% roztwór alkoholu etylowego przez sześć tygodni dobowe spożycie etanolu wyniosło średnio 5 ± 1 g/kg masy ciała. Analiza statystyczna nie wykazała istotnego wpływu spożywania alkoholu etylowego przez 2 lub 6 tygodni na poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w wątrobie, stwierdzono natomiast istotne obniżenie aktywności reduktazy glutationowej po 2-tygodniowym, ale nie 6-tygodniowym, okresie spożywania 10% roztworu etanolu, co świadczy o zachwianiu mechanizmów obrony antyoksydacyjnej tego narządu.

Słowa kluczowe: etanol, reaktywne formy tlenu (RFT), całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS), reduktaza glutationowa (GR), szczury Wistar

WPROWADZENIE

Produktami niepełnej redukcji tlenu w organizmie są reaktywne formy tlenu (RFT) będące jonami lub cząsteczkami neutralnymi, a także wolnymi rodnikami tlenowymi. Te ostatnie są formami wysoko reaktywnymi – charakteryzują się niestabilną strukturą molekularną, przez co dążą do połączenia z innymi cząsteczkami, atomami lub pojedynczymi elektronami w celu utworzenia związku stabilnego (1). Wchodzą w reakcje z lipidami, białkami, kwasami nukleinowymi i węglowodanami obecnymi w komórkach, tworząc w ten sposób kolejne produkty wolnorodnikowe (2, 3). Nadmierne ilości RFT wywołują zmiany struktury oraz zaburzenia w funkcjonowaniu białek, kwasów nukleinowych i tłuszczów, co może prowadzić do uszkodzenia błon komórkowych i stymulować procesy apoptozy (2).

Stres oksydacyjny jest związany z zaburzeniem równowagi między wytwarzaniem i aktywnością reaktywnych form tlenu a mechanizmami obronnymi organizmu odpowiedzialnymi za ich eliminację (4). Odgrywa on znaczącą rolę w powstawaniu wielu schorzeń, takich jak miażdżyca, cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory, a także choroby ośrodkowego układu nerwowego i układu pokarmowego (2).

RFT biorą udział w wielu procesach metabolicznych, dlatego komórki rozwinęły odpowiednie mechanizmy obronne w celu zapobiegania nadprodukcji RFT lub ich eliminowania. W prawidłowych warunkach nadmiar reaktywnych form tlenu jest usuwany, a uszkodzenia, dzięki skutecznemu działaniu enzymatycznych i nieenzymatycznych związków przeciwutleniających, są naprawiane. Ochronę przed szkodliwym działaniem wolnych rodników stanowią mechanizmy o charakterze enzymatycznym, czyli enzymy komórkowe, które uczestniczą w eliminacji wolnych rodników tleno-

wych m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), katalaza, transferaza glutationowa (GST) oraz reduktaza glutationowa (GR), a także mechanizmy nieenzymatyczne, które obejmują działanie antyoksydantów pochodzenia egzogenego i endogenego (5, 6).

Jednym z czynników indukujących wytwarzanie reaktywnych form tlenu jest alkohol etylowy, którego szkodliwy wpływ na organizm zależy, między innymi, od wywołanego stresu oksydacyjnego (7). Liczne prace potwierdzają, że narażenie na alkohol indukuje wzrost produkcji RFT (8, 9, 10, 11), a narządem szczególnie narażonym na działanie reaktywnych form tlenu powstających w czasie metabolizmu etanolu jest wątroba, w której ten metabolizm zachodzi (12).

Napoje alkoholowe są obecnie najpowszechniej stosowaną używką wśród młodzieży. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że spożywanie alkoholu przez młodzież bezpośrednio zagraża rozwojowi fizycznemu i zdrowiu tej części populacji (13). Konsekwencje nadmiernego spożywania alkoholu u osób w okresie wzrostu mogą być bardziej dotkliwe niż u osób dorosłych, gdyż młody organizm jest bardziej wrażliwy na toksyczne działanie etanolu i jego metabolitów.

Celem pracy było określenie wpływu spożywania alkoholu etylowego na poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego oraz aktywność reduktazy glutationowej w wątrobie młodych samców Wistar, które stanowiły model spożywania alkoholu przez dorastającą młodzież.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na 25 młodych samcach szczurów Wistar outbreed Cmd: (WI)WU o początkowej masie ciała 94 ± 2 g. Zwierzęta, po tygodniowym okresie adaptacyjnym, podzielono na 4 grupy: 2 grupy badawcze (E2, $n = 6$ i E6, $n = 7$) i 2 grupy kontrolne (K2, $n = 6$ i K6, $n = 6$). Szczury z grup badawczych przez 2 (E2) lub 6 (E6) tygodni spożywały w fazie nocnej 10% roztwór alkoholu etylowego, natomiast w ciągu dnia otrzymywały w drugim poidelku wodę *ad libitum*. Samce z grup kontrolnych otrzymywały wyłącznie wodę *ad libitum*. Wszystkie zwierzęta karmiono *ad libitum* paszą Labofeed H. Zwierzęta były trzymane w pojedynczych polipropylenowych klatkach w pomieszczeniu o standardowych warunkach: temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), wilgotność powietrza (50–60%), cykl świetlny 12:12 (8:00–20:00, faza jasna). Spożycie alkoholu etylowego oraz wody było kontrolowane codziennie, raz w tygodniu kontrolowano przyrosty masy ciała.

Po zakończeniu poszczególnych etapów doświadczenia (2 i 6 tygodni) szczury usypiano przez dootrzewnowe podanie tiopentalu w dawce 120 mg/kg masy ciała. W narkozie pobrano krew z lewej komory serca, a po skrwawieniu zwierzęcia pobrano wątrobę, którą po opłukaniu w płynie fizjologicznym, zamrożono w ciekłym azocie i do momentu rozpoczęcia oznaczeń przechowywano w temperaturze -80°C . Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę III Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

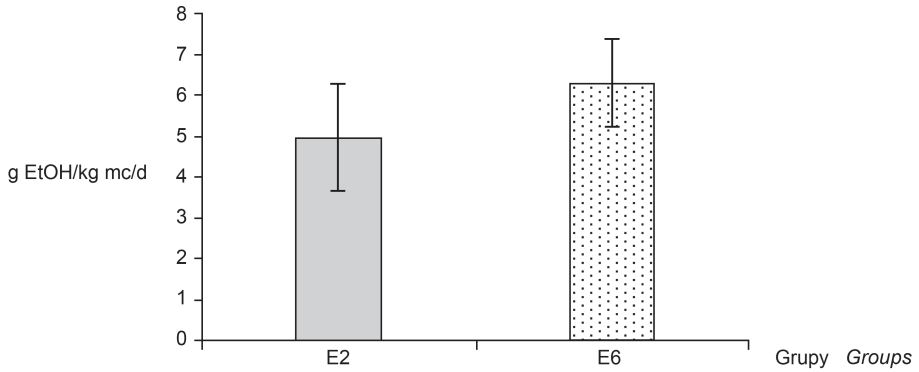
Aktywność reduktazy glutationowej (GR) oraz poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAS) w homogenatach wątroby oznaczono za pomocą gotowych zestawów firmy RANDOX (nr kat. NX 2332 oraz GR 2368), postępując zgodnie z instrukcją producenta.

Wyniki TAS podano w mmol, a aktywność GR wyrażono w mU w przeliczeniu na mg białka oznaczonego w homogenatach wątroby metodą Bradtforda (14) z wykorzystaniem białka wzorcowego BSA (*Bovine Serum Albumin*) jako standardu. Wyniki przedstawiono podając wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Analizę statystyczną, po sprawdzeniu normalności rozkładu, przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta, dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, w której badanymi czynnikami było picie alkoholu oraz czas trwania doświadczenia, a także testu najmniejszych istotnych różnic (NIR) Fishera. Za istotne statystycznie uznano wyniki, dla których wartość $p \leq 0,05$. Analiza statystyczna została wykonana przy zastosowaniu programu Statistica wersja 8.0 (Statsoft).

WYNIKI

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w średnim, dobowym spożyciu czystego etanolu w przeliczeniu na kg masy ciała (test t-Studenta, NS). Średnie dzienne spożycie czystego etanolu w przeliczeniu na kg masy ciała w obu grupach eksperymentalnych było podobne (patrz rys. 1). W czasie dwóch tygodni trwania doświadczenia średnie spożycie etanolu przez jedno zwierzę w ciągu doby w przeliczeniu na masę ciała wyniosło 6 ± 1 g. U zwierząt, którym podawano 10% roztwór etanolu przez okres sześciu tygodni dobowe spożycie roztworu alkoholu z uwzględnieniem masy ciała było nieco niższe (5 ± 1 g etanolu/kg masy ciała/dobę).

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu picia alkoholu oraz czasu z uwzględnieniem 1 oraz 2 tygodni trwania eksperymentu na przyrosty masy ciała szczurów z grupy E2 i K2 (ANOVA, NS). Ponadto nie obserwowano wpływu interakcji tych dwóch czynników na badany parametr. Całkowity przyrost masy ciała w grupie E2 wyniósł 120 ± 17 g, a w grupie K2 123 ± 11 g, a tempo przyrostu masy ciała zwierząt w grupie kontrolnej i eksperymentalnej po 2 tygodniach było podobne. Jednocześnie dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała wysoce istotny wpływ picia alkoholu (ANOVA, $F_{(1,91)} = 18,15$, $p = 0,0000$) oraz czasu trwania doświadczenia z uwzględnieniem 1, 2, 3, 4, 5 oraz 6 tygodni eksperymentu (ANOVA, $F_{(6,91)} = 277,15$, $p = 0,0000$) na przyrosty masy ciała szczurów z grupy E6 i K6. Nie wykazano wpływu interakcji tych dwóch czynników na badany parametr. W przypadku zwierząt, które były narażone na działanie alkoholu przez 6 tygodni, przyrosty ich masy ciała w stosunku do zwierząt kontrolnych przez pierwsze 2 tygodnie trwania doświadczenia były zbliżone, ale od czwartego tygodnia różnice w tym parametrze między grupą E6 a K6 były już istotne statystycznie, z niższymi wartościami w grupie otrzymującej etanol. Po 4., 5. oraz 6. tygodniach trwania doświadczenia przyrosty



test t-Studenta: E2 vs E6, NS

E2 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 2 tygodnie
rats drinking 10% of ethanol solution during 2 weeks

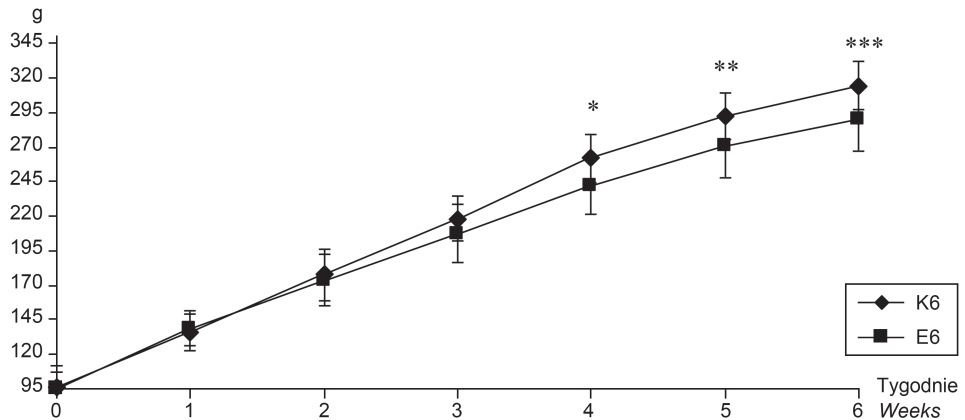
E6 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 6 tygodni
rats drinking 10% ethanol solution during 6 weeks

NS – nieistotne statystycznie *statistically insignificant*

Rysunek 1.

Spożycie etanolu (g EtOH/kg mc/d) (średnia \pm SD)

Ethanol intake (g EtOH/kg bw/24 h) (mean \pm SD)



test NIR Fishera K6 vs E6 * $p=0,0104$; ** $p=0,0061$; *** $p=0,0019$

E6 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 6 tygodni
rats drinking 10% ethanol solution during 6 weeks

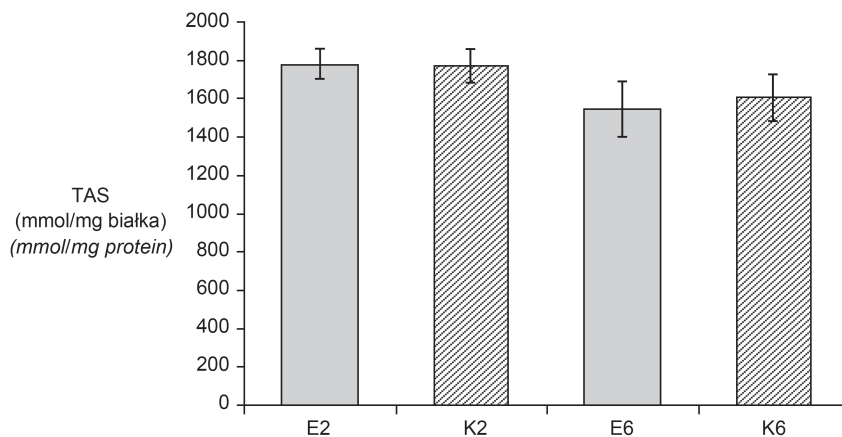
K6 – grupa kontrolna 6 tygodni *control group 6 weeks*

Rysunek 2.

Przyrost masy ciała szczurów w ciągu 6 tygodni ekspozycji na alkohol (g) (średnia \pm SD)

Changes in rats body weight gain during 6 weeks alcohol consumption (g) (mean \pm SD)

masy ciała samic spożywających roztwór alkoholu etylowego w stosunku do grupy kontrolnej były istotnie niższe (test NIR Fishera, odpowiednio $p=0,0104$; $p=0,0061$; $p=0,0019$) (patrz rys. 2).



ANOVA: NS

E2 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 2 tygodnie
rats drinking 10% ethanol solution during 2 weeks

E6 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 6 tygodni
rats drinking 10% ethanol solution during 6 weeks

K2 – grupa kontrolna 2 tygodnie *control group 2 weeks*

K6 – grupa kontrolna 6 tygodni *control group 6 weeks*

NS – nieistotne statystycznie *statistically insignificant*

Rysunek 3.

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS) w wątrobie szczurów (średnia \pm SD)

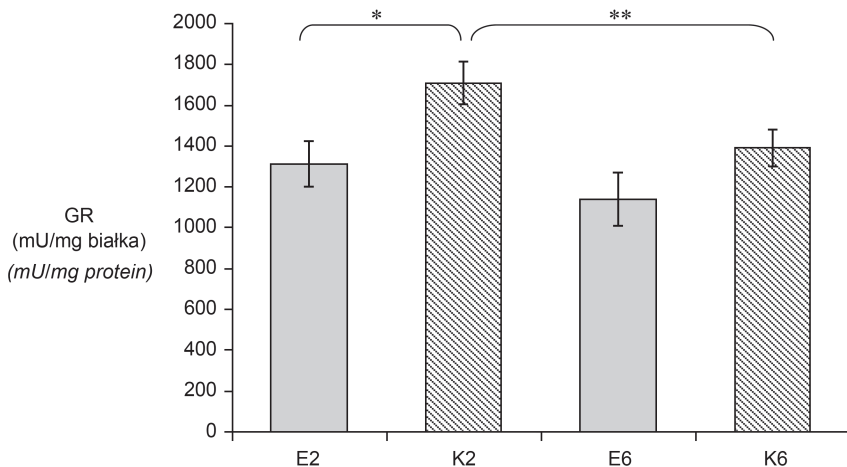
Total antioxidant status (TAS) in liver of rats (mean \pm SD)

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu spożywania alkoholu oraz czasu trwania doświadczenia na poziom TAS w wątrobie szczurów (ANOVA, NS) (patrz rys. 3).

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ spożywania alkoholu (ANOVA, $F_{(1,21)} = 9,5591$, $p = 0,0055$) oraz czasu trwania eksperymentu (ANOVA, $F_{(1,21)} = 5,3499$, $p = 0,0309$) na aktywność GR. Natomiast nie stwierdzono wpływu interakcji tych dwóch czynników na badany parametr. Wykazano istotne obniżenie aktywności GR w grupie E2 w stosunku do grupy K2 (test NIR Fishera, $p = 0,0158$). Należy dodać, że stwierdzono również zmiany aktywności tego enzymu w grupach kontrolnych, istotnie niższą aktywność w grupie K6 w porównaniu do grupy K2 (test NIR Fishera, $p = 0,0495$), ale w obu przypadkach były to wartości wyższe od obserwowanych w obu grupach eksperymentalnych (patrz rys. 4).

DYSKUSJA

Porównywanie uzyskanych wyników z wynikami innych badaczy jest trudne z uwagi na odmienne warunki prowadzenia doświadczeń *in vivo*. Przede wszystkim dotyczy to narażenia na działanie alkoholu, który może być podawany dożyłkowo



test NIR Fishera: * $p = 0,0158$; ** $p = 0,0495$

- E2 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 2 tygodnie
rats drinking 10% ethanol solution during 2 weeks
- E6 – szczury spożywające 10% roztwór etanolu przez 6 tygodni
rats drinking 10% ethanol solution during 6 weeks
- K2 – grupa kontrolna 2 tygodnie *control group 2 weeks*
- K6 – grupa kontrolna 6 tygodni *control group 6 weeks*

Rysunek 4.

Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w wątrobie szczurów (średnia \pm SD)
Glutathione reductase (GR) activity in liver of rats (mean \pm SD)

poprzez sondę (7) lub *per os* (15), a także czasu narażenia na alkohol – krótkiego (7) lub długotrwałego (15, 16).

Porównanie krzywych ilustrujących dynamikę przyrostu masy ciała zwierząt z grupy spożywającej 10% roztwór etanolu przez sześć tygodni i samców z grupy kontrolnej sugeruje, że przewlekłe spożywanie alkoholu etylowego przez zwierzęta dojrzewające ogranicza przyrost ich masy ciała. Możliwe, że gdyby ekspozycja na roztwór etanolu trwała dłużej, to różnice te byłyby jeszcze większe. Chauhan i wsp. (15) w swoim badaniu wykazali także, że podawanie 30% roztworu alkoholu etylowego (w dawce 1 ml/kg masy ciała) przez 40 dni istotnie obniżyło przyrost masy ciała szczurów w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. Należy podkreślić, że u szczurów jednorazowe, doustne podanie 1 ml 50% alkoholu etylowego wywołuje ostre uszkodzenie błony śluzowej żołądka (17), a zwierzęcy model nieżyty żołądka spowodowanego przewlekłym spożywaniem alkoholu etylowego Hernandez-Rincon i wsp. uzyskali poprzez dożołądkowe podawanie szczurom 1 ml 50% roztworu etanolu przez kilka dni (18). Można zatem podejrzewać, że we wspomnianym już badaniu Chauhan i wsp. (15) ekspozycja zwierząt na 30% roztwór etanolu przez ponad miesiąc mogła spowodować poważne uszkodzenia błony śluzowej żołądka powodując ograniczony przyrost masy ciała. Według Lieber (19) ekspozycja na etanol zaburza przyrost masy ciała poprzez niekorzystny wpływ alkoholu m.in. na trawienie, wchłanianie, transport oraz wykorzystanie niezbędnych składników odżywczych.

Spożywanie etanolu powoduje uszkodzenie nabłonka jelita, co zakłóca transport substancji odżywczych do krwi i upośledza wchłanianie składników pokarmowych (20). Nadmierne spożywanie alkoholu może także ograniczać wykorzystanie składników pokarmowych m.in. poprzez oddziaływanie na magazynowanie i usuwanie ich z organizmu (21). Ponieważ w badaniu własnym zwierzęta spożywały alkohol w warunkach wolnego wyboru, a więc nie była to sytuacja stresowa, należy przypuszczać, że zahamowanie wzrostu wynikało raczej z wpływu alkoholu na wspomniane wyżej funkcje przewodu pokarmowego, a nie z mechanicznego uszkodzenia jego ścian.

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS) jest wskaźnikiem zdolności obrony organizmu przed potencjalnym atakiem wolnych rodników. Obejmuje on zarówno enzymy antyoksydacyjne (m.in: dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydazę glutationową, selenoproteiny, katalazę, ligazę γ -glutamylu-cysteinyłową, glutation, syntetazę glutationową, reduktazę glutationową, S-transferazę glutationową), jak i drobno-cząsteczkowe antyoksydanty, np. witaminy o działaniu antyoksydacyjnym (witaminy A, C i E) (22).

W badaniu własnym nie wykazano istotnego statystycznie wpływu spożywania 10% roztworu alkoholu etylowego na poziom TAS w wątrobie szczurów. Brak różnic w poziomie TAS po dwóch tygodniach doświadczenia może być spowodowany zbyt krótkim okresem narażenia zwierząt na roztwór etanolu. Możliwe, że w tak krótkim czasie nie dochodzi jeszcze do ogólnego zmniejszenia poziomu antyoksydantów w organizmie lub na skutek zmniejszenia stężenia jednych przeciwutleniaczy wzrasta poziom innych, co skutkuje brakiem zmian w poziomie całkowitego statusu antyoksydacyjnego. Również w innym doświadczeniu przeprowadzonym na młodych samcach szczepu Wistar nie zaobserwowano zmian w poziomie TAS w osoczu zwierząt spożywających przez 2 oraz 6 tygodni 10% roztwór etanolu w stosunku do grup kontrolnych (23). Lutnicki i wsp. (7) zaobserwowali jednak istotne obniżenie poziomu TAS w osoczu szczurów szczepu Wistar po 12. i 24. godzinach od jednorazowego podania sondą dożołądkową 50% roztworu etanolu w ilości 5 ml/kg masy ciała, w porównaniu z grupą kontrolną, a obniżenie poziomu TAS nasilało się w czasie, czemu towarzyszył spadek aktywności GPx. Autorzy tych badań, podobnie jak Das i wsp. (24), łączą obniżony poziom GPx z dostępnością glutationu, którego ilość zmniejsza się po spożyciu alkoholu. Należy podkreślić, że 50% alkohol był aplikowany bezpośrednio do żołądka, a jak już wcześniej wspomniano, doustne podanie tak silnego roztworu etanolu powoduje uszkodzenie błony śluzowej tego narządu (17), dlatego obserwowane w tym doświadczeniu zmiany w poziomie TAS i aktywności GPx były zapewne skutkiem uszkodzeń błony śluzowej. Aktywność GPx jest uzależniona od równowagi między poziomem w formie zredukowanej i utlenionej glutationu (25), tak więc enzym ten wspólnie z reduktazą glutationową utrzymuje w równowadze wewnątrzkomórkowy status oksydoredukcyjny (26). W doświadczeniu Das i wsp. (24) przeprowadzonym na 8.-10. tygodniowych myszach, którym podawano przez 4 lub 12 tygodni roztwór etanolu w dawce 1,6 g etanolu/kg masy ciała/dziennie, stwierdzono istotne obniżenie poziomu TAS w osoczu po 4 i 12 tygodniach trwania doświadczenia w stosunku do grupy kontrolnej. Im dłuższy był czas intoksykacji

etanolem, tym poziom TAS był niższy. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w aktywności reduktazy glutationowej oraz innych enzymów antyoksydacyjnych (GPx, GST, SOD, katalazy) po 4 tygodniach doświadczenia. Należy dodać, że po 12 tygodniach nastąpił znaczący spadek aktywności GR oraz GPx i katalazy we krwi zwierząt narażonych na etanol w stosunku zarówno do grupy kontrolnej, jak i grupy zwierząt, którym podawano alkohol etylowy przez krótszy okres czasu. Badacze ci sugerują, iż znaczące obniżenie aktywności GR po 12 tygodniowej ekspozycji na etanol może być dominującą przyczyną uszczuplenia zasobów glutationu wewnątrz erytrocytów, co w konsekwencji powoduje intensyfikację procesów peroksydacji lipidów oraz niszczenia czerwonych krwinek (27). Z kolei obniżenie aktywności GPx może być związane z wyczerpaniem lub inaktywacją tego enzymu przez RFT (28) oraz zmniejszeniem aktywności GR, co również może mieć związek z zubożeniem zasobów glutationu i mogło być przyczyną obserwowanego w doświadczeniu własnym spadku aktywności GR po 6 tygodniach. Glutation jest bowiem głównym niebiałkowym składnikiem tioli, odgrywającym kluczową rolę w obronie antyoksydacyjnej organizmu. Jest on zaangażowany w utrzymanie prawidłowej struktury oraz funkcji komórek poprzez udział w reakcjach enzymatycznych (26). Przewlekłe spożywanie etanolu powoduje zmniejszenie ilości glutationu, zwłaszcza w mitochondriach, w których poziom GSH utrzymuje się na wysokim poziomie (29) oraz uszczuplenie wewnątrzkomórkowych zasobów glutationu w wątrobie i mózgu (30). Badania wykazały, że ostra intoksykacja etanolem powoduje zmiany w endogennej puli tioli, co jest związane z indukcją białek stresowych w różnych obszarach wątroby oraz mózgu (31).

Gasbarrini i wsp. (32) w swoim doświadczeniu podawali szczurom Wistar przez 6 tygodni dietę zawierającą alkohol etylowy (w dawce 1,1 g/100 g). Badacze zaobserwowali istotnie wyższy poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w osoczu zwierząt z grupy spożywającej etanol w porównaniu z kontrolną. Podobne wyniki otrzymano w badaniu przeprowadzonym na innej linii szczurów – na młodych samcach *Warsaw High Preferring* (WHP), u tych zwierząt wykazano znaczny wzrost poziomu TAS w osoczu w grupie otrzymującej 10% etanol przez 6 tygodni w stosunku do grupy kontrolnej, a także w grupie kontrolnej 2. tygodniowej istotnie wyższy poziom TAS w porównaniu do grupy 6. tygodniowej (23). Należy jednak podkreślić, że w powyższym doświadczeniu wykorzystano wyselekcjonowaną linię szczurów o utrwalonej preferencji do zwiększonego spożywania alkoholu (≥ 5 g czystego etanolu/kg m.c/d) w warunkach wolnego wyboru pomiędzy 10% roztworem alkoholu a wodą (33). Efektem wypijania przez szczury WHP znacznych ilości 10% roztworu alkoholu są objawy uzależnienia fizycznego (34). Zatem zmiany w poziomie całkowitego statusu antyoksydacyjnego, a co za tym idzie również w aktywności poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych, mogą wynikać z różnic w zastosowanych modelach badawczych. W niniejszym badaniu wykorzystano szczury Wistar, które nie są genetycznie przystosowane do spożywania nadmiernych ilości alkoholu, jak ma to miejsce u szczurów WHP będących odpowiednikiem modelu alkoholizmu u ludzi, a zatem te zwierzęta będą w odmienny sposób reagowały na

ekspozycję na etanol. Ponadto zmiany w poziomie TAS mogą być również związane z wiekiem zwierząt. Sivoňová i wsp. (35) zaobserwowali, że u szczurów Wistar wraz z wiekiem obniża się poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w osoczu. Również badania przeprowadzone przez innych autorów potwierdzają wpływ wieku na obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego u szczurów Wistar i Fischer 344 (36, 37). Jednakże podobne badania przeprowadzone na szczurach Sprague-Dawley nie wykazały zmian w poziomie TAS w osoczu w zależności od wieku zwierząt (38).

Według Augustyniak i Skrzydlewskiej (39) zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych, m.in. reduktazy glutationowej, związane z wiekiem zależą od wielu czynników m.in. rasy, płci zwierząt, a także narządu i lokalizacji subkomórkowej danego enzymu. Obniżenie aktywności tych enzymów wraz z wiekiem może sugerować, że cząsteczki enzymów ulegają modyfikacjom spowodowanym przez RFT, natomiast wzrost aktywności może być traktowany jako odpowiedź adaptacyjna komórki na nadmierną produkcję RFT. W badaniu własnym zaobserwowano istotny spadek aktywności GR u zwierząt kontrolnych, nienarażonych na działanie etanolu po 6. tygodniach doświadczenia w stosunku do zwierząt będących w eksperymencie jako kontrola przez 2 tygodnie. Zatem u szczurów Wistar obserwuje się również wpływ wieku na obniżenie aktywności tego enzymu w wątrobie. Również w badaniach prowadzonych z udziałem ludzi badacze obserwują, że wraz z wiekiem następuje spadek aktywności GR (40). Badania nad aktywnością reduktazy glutationowej w cytozolu wątroby samców Fischer 344 wykazały natomiast, że aktywność GR ulega wraz z wiekiem najpierw podwyższeniu, a następnie obniżeniu (41).

W badaniu własnym po dwutygodniowym czasie ekspozycji na alkohol, a więc przy krótkotrwałym narażeniu organizmu na działanie etanolu, doszło do obniżenia aktywności reduktazy glutationowej, a być może zwiększenia aktywności innych enzymów jako odpowiedzi organizmu na wzrost produkcji RFT, co skutkuje utrzymaniem wartości TAS na tym samym poziomie. Natomiast dłuższy czas trwania doświadczenia spowodował, że aktywność GR była niższa zarówno w grupie kontrolnej, jak i grupie spożywającej etanol, ale różnice między obiema grupami nie były istotne statystycznie. Natomiast w badaniu prowadzonym na młodych samcach linii WHP zaobserwowano, że podawanie 10% roztworu etanolu przez 6 tygodni istotnie obniżyło aktywność GR w erytrocytach w porównaniu z grupą kontrolną (23). Obserwowany spadek aktywności GR może być więc związany z zaburzeniami konwersji formy utlenionej glutationu (GSSG) w formę zredukowaną (GSH) lub modulacji stosunku GSH/GSSG.

W badaniach Kasdallah-Grissa i wsp. (42) spożywanie przez dorosłe szczury Wistar 35% roztworu alkoholu etylowego przez 6 tygodni również nie spowodowało zmian aktywności GR w wątrobie, jednakże stwierdzono znaczną redukcję aktywności innych enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx) oraz katalazy. Zatem u dorosłych szczurów nawet podawanie mocniejszego roztworu etanolu nie wpłynęło na aktywność reduktazy glutationowej. Dahiru i Obidoa (27) zaobserwowali, że podawanie szczurom Wistar diety

zawierającej aż 40% roztwór etanolu przez 6 tygodni spowodowało istotne obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (GR, GPx, SOD i katalazy) w wątrobie. Obniżenie aktywności tych enzymów w efekcie może doprowadzić do kumulacji RFT i nasilenia szkodliwych skutków ich działalności, jak chociażby upośledzenia funkcji oraz uszkodzenia integralności błon komórkowych (43).

Inny efekt uzyskali autorzy badający wpływ słabego roztworu etanolu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Oh i wsp. (44) wykazali, że po sześciotygodniowej ekspozycji na 5% (w/v) etanol w wątrobie dorosłych szczurów Sprague-Dawley doszło do wzrostu aktywności GR, S-transferazy glutationowej i katalazy, przy jednoczesnym spadku aktywności GPx. Ich badania potwierdzają również zmianę stosunku glutationu do jego formy zredukowanej, wskazując na znaczną przewagę GSH. Ojeda i wsp. (45) przeprowadzili badanie na młodych szczurach Wistar, które były narażone na działanie etanolu w okresie płodowym i w okresie laktacji. U potomstwa samic, którym podawano 20% roztwór alkoholu etylowego, zaobserwowano wzrost aktywności GR i katalazy oraz obniżeniem aktywności GPx. Może to świadczyć o adaptacji komórek do stresu oksydacyjnego w kierunku utrzymania prawidłowego poziomu glutationu lub też obniżenia ilości NADPH, którego wzrost obserwuje się przy intoksykacji etanolem. Potwierdza to badanie Augustyniak i wsp. (46), w którym wykazano znaczne zmniejszenie u samców szczepu Wistar poziomu GSH na skutek spożywania diety zawierającej etanol (stanowiący 36% wartości energetycznej diety). Ponadto autorzy ci zaobserwowali istotny wzrost aktywności GR u dwumiesięcznych szczurów spożywających przez 5 tygodni dietę z etanolem w porównaniu z grupą kontrolną. W tym przypadku zwiększenie aktywności GR oraz GSH w wątrobie może świadczyć o przystosowaniu komórek do stresu oksydacyjnego.

Calabrese i wsp. (47) w swoich badaniach wydłużyli ekspozycję na 20% roztwór etanolu do 25 miesięcy i wykazali, że w wątrobach szczurów Wistar doszło do spadku poziomu glutationu, przy równoczesnym wzroście stężenia zredukowanej formy GSH, która jest wytwarzana przy udziale peroksydazy glutationowej, co sugeruje, że poziom GPx znacznie wzrasta przy przewlekłym spożywaniu alkoholu etylowego.

Zmiany w wybranych parametrach obrony antyoksydacyjnej w wątrobie samców otrzymujących roztwór alkoholu etylowego mogą być nie tylko efektem spożywania etanolu, ale również konsekwencją zaburzeń w gospodarce wodno-elektrolitowej szczurów prowadzącej do nieprawidłowości w funkcjonowaniu nerek. Ten aspekt, choć niewątpliwie bardzo istotny, w poniższej pracy nie był rozpatrywany.

W badaniach prowadzonych z udziałem ludzi, Maturu i wsp. (48) stwierdzili istotnie wyższą aktywność GR i SOD, a niższy poziom glutationu we krwi alkoholików spożywających około 125 g etanolu/kg masy ciała pięć razy w tygodniu przez 10–12 lat, w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto zaobserwowano u nich wzrost aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, która katalizuje pierwszą reakcję szlaku pentozofosforanowego, w wyniku którego wytwarzane są znaczne ilości NADPH – kofaktora niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania GR (49). Zatem u osób nadużywających alkoholu zwiększona aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej może poprzez wzrost poziomu NADPH zwiększać aktywność GR,

a tym samym powodować także wzrost poziomu GSH. Natomiast Das i Vasudevan (50) zaobserwowali, że u pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem wątroby, w porównaniu z osobami zdrowymi, dochodzi do znaczącego spadku aktywności GR oraz GPx, a także do wzrostu aktywności S-transferazy glutationowej. Obniżony poziom GR we krwi osób uzależnionych od alkoholu stwierdzono także w badaniach Kulkarni i wsp. (51). Możliwe, że spadek aktywności GR był w tym przypadku spowodowany stłuszczeniem wątroby. Już po kilkunastodniowym okresie spożywania dużych ilości alkoholu może pojawić się stłuszczenie wątroby z nagromadzeniem kropelek tłuszczu w całym narządzie. Jest to stan odwracalny jeśli zostanie wprowadzona abstynencja lub ograniczenie ilości spożywanego alkoholu (52). Nadmierne spożywanie alkoholu etylowego prowadzi również do niedoborów niacyny, co według Pollak i wsp. (53) może potęgować toksyczne działanie RFT. Deficyt niacyny może prowadzić również do zmniejszenia poziomu NADPH, a to z kolei może przyczyniać się do spadku aktywności GR i tym samym poziomu GSH.

WNIOSKI

1. Przewlekłe spożywanie alkoholu etylowego ogranicza przyrost masy ciała młodych samców, co w konsekwencji przyczynia się do wolniejszego wzrostu zwierząt.
2. Spożywanie roztworu alkoholu etylowego w krótkim okresie czasu (2 tygodnie) obniża istotnie aktywność reduktazy glutationowej w wątrobie szczurów, co może świadczyć o zachwianiu mechanizmów wątrobowej obrony antyoksydacyjnej u rosnących organizmów w sytuacji krótkotrwałego narażenia na tą substancję.
3. Obniżenie aktywności reduktazy glutationowej w grupie zwierząt nienarażonych na działanie etanolu przez 6 tygodni w stosunku do grupy 2 tygodniowej może świadczyć o wpływie RFT na modyfikacje cząsteczek tego enzymu, co może być związane z wiekiem zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

1. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford: Oxford University Press.
2. Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J, Wawel I, Łącki J, Śliwińska-Stańczyk P (2007) Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia*, 45, 5, 284–289.
3. Wu D, Cederbaum AI (2003) Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Research and Health*, 27, 4, 277–284.
4. Kalisz O, Wolski T, Gerkowicz M, Morawski M (2007) Reaktywne formy tlenu (RFT) oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia*, LXII, 1, 87–99.
5. Fang Y, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872–879.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44–84.

7. Lutnicki K, Szpringer E, Marciniak A (2006) Zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u szczurów wywołane działaniem etanolu. *Medycyna Weterynaryjna*, 62, 6, 683–685.
8. Das SK, Vasudevan DM (2005) Biochemical diagnosis of alcoholism. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20, 35–42.
9. Dinu D, Nechifor MT, Movileanu L (2005) Ethanol-induced alterations of the antioxidant defense system in rat kidney. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19, 386–395.
10. Ostrowska J, Luczaj W, Kasacka I, Rozanski A, Skrzydlewska E (2004) Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol*, 32, 25–32.
11. Pathak A, Mahmood A, Pathak R, Dhawan D (2004) Role of zinc on lipid peroxidation and antioxidative enzymes in intestines of ethanol-fed rats. *Biological Trace Element Research*, 100, 247–257.
12. Lieber CS (1994) Alcohol and the liver. *Gastroenterology*, 106, 1085–105.
13. Jernigan D H. (2001) Global Status Report: Alcohol and young people, Geneva: World Health Organization, Mental Health and Substance Dependence Department.
14. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
15. Chauhan SS, Ojha S, Mahmood A (2011) Modulation of lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat intestine by subchronic fluoride and ethanol administration. *Alcohol*, 45, 7, 663–672.
16. Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Barcellona ML, Rizza V (1996) Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 391–398.
17. Sibilia V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C (2003) Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology*, 144, 1, 353–359.
18. Hernandez-Rincon I, Olguin-Martinez M, Hernandez-Munoz H (2003) Enhanced intracellular calcium promotes metabolic and secretory disturbances in rat gastric mucosa during ethanol-induced gastritis. *Experimental Biology and Medicine*, 228, 315–324.
19. Lieber CS (2003) Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Research and Health*, 27, 220–231.
20. Feinman L, Lieber, CS (1998) Nutrition and diet in alcoholism. W: Shills ME, Oslon JA, Shike M, Ross AC (red.) *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1523–1542
21. Thomson AD, Pratt OE (1992) Interaction of nutrients and alcohol: absorption, transport, utilization, and metabolism. W: Watson RR, Watzl B (red.) *Nutrition and Alcohol*. Boca Raton, FL: CRC Press, 75–99.
22. Gawłowska M, Rabe-Jabłońska J (2008) Genetyka obrony antyoksydacyjnej. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia*, 3, 2, 37–46.
23. Oczkowski M (2010) Wpływ spożycia napojów alkoholowych na dojrzewanie płciowe oraz proces steroidogenezy w gonadach i jej hormonalną regulację. Praca doktorska, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW Warszawa.
24. Das SK, Varadhan S, Gupta G, Mukherjee S, Dhanya L, Rao DN, Vasudevan DM (2009) Time-dependent effects of ethanol on blond oxidative stress parameters and cytokines. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46, 116–121.
25. Kulkarni SR, Ravindra KP, Dhume CY, Rataboli P, Rodrigues E (2009) Levels of plasma testosterone, antioxidants and oxidative stress in alcoholic patients attending de-addiction centre. *Biology and Medicine*, 1, 4, 11–20.
26. Wu G, Fang YZ, Sheng Y, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134, 489–492.
27. Dahiru D, Obidoa O (2008) Evaluation of the antioxidant effects of *Ziziphus mauritiana* lam. leaf extracts against chronic ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. *The African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 1, 39–45.

28. Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova L, Popov P (2001) Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *Journal of Biomedical Science*, 8, 59–70.
29. Bardag-Gorce F, Oliva J, Lin A, Li J, French BA, French SW (2011) Proteasome inhibitor up regulates liver antioxidative enzymes in rat model of alcoholic liver disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 90, 1, 123–130.
30. Calabrese V, Spadaro F, Dinotta F, Ravagna A, Randazzo F, Randazzo G, Ragusa N, Rizza V (1998) Long-term ethanol administration enhances urinary ultraweak luminescence and age-dependent modulation of redox in central and peripheral organs of the rat. *International Journal of Tissue Reactions*, 20, 57–62.
31. Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Barcellona M L, Rizza V (1996) Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 391–398.
32. Gasbarrini A, Addolorato G, Simoncini M, Gassbarrini G, Fantozzi P, Mancini F, Montanari L, Nardini M, Ghiselli A, Scaccini C (1998) Beer affects oxidative stress due to ethanol in rats. *Digestive Diseases Sciences*, 43, 6, 1332–1338.
33. Dyr W, Ćwiek M, Kostowski W (2009) Znaczenie wyselekcjonowanych linii szczurów WHP i LP w badaniach mechanizmu działania alkoholu. *Alkoholizm i Narkomania*, 22, 2, 177–187.
34. Dyr W, Rok-Bujko P, Kostowski W (2007) Instrumentalne samopodawanie alkoholu przez szczury linii WHP i WLP. *Alkoholizm i Narkomania*, 20, 3, 313–320.
35. Sivoňová M, Tatarková Z, Ďuračková Z, Dobrota D, Lehotský J, Matáková T, Kaplán P (2007) Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged rats. *Physiological Research*, 56, 757–764.
36. Facino RM, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, Morazzoni P (1999) Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sciences*, 64, 627–642.
37. Kim JW, No JK, Ikeno Y, Yu BP, Choi JS, Yokozawa T, Chung HY (2002) Age-related changes in redox status of rat serum. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34, 9–17.
38. Nakamura YK, Omaye ST (2004) Age-related changes of serum lipoprotein oxidation in rats. *Life Sciences*, 23, 1265–1275.
39. Augustyniak A, Skrzydlewska E (2004) Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 58, 194–201.
40. Erden-İnal M, Sunal E, Kanbak G (2002) Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochemistry and Function*, 20, 1, 61–66.
41. Rikans LE, Moore DR, Snowden CD (1991) Sex dependent differences in the effects of aging on antioxidant defence mechanisms of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1074, 195–200.
42. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, May M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaâ S (2007) Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sciences*, 80, 1033–1039.
43. Sheela CG, Angusti KT (1995) Antiperoxide effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from *Allium sativum* Linn and gugu lipid in cholesterol diet fed rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 33, 337–341.
44. Oh SI, Kim CI, Chun HJ, Park SC (1998) Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *Journal of Nutrition*, 128, 758–763.
45. Ojeda L, Nogales F, Vázquez B, Delgado J, Murillo M, Carreras O (2009) Pharmacology and cell metabolism. Alcohol, gestation and breastfeeding: Selenium as an antioxidant therapy. *Alcohol and Alcoholism*, 44, 3, 272–277.
46. Augustyniak A, Waszkiewicz E, Skrzydlewska E (2005) Preventive action of green tea from changes on the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol. *Nutrition*, 21, 925–932.

47. Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Reale S, Barcellona ML, Rizza V (1998) Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 7/8, 1159–1167.
48. Maturu P, Reddy VD, Padmavathi P, Varadacharyulu N (2011) Ethanol induced adaptive changes in blood for the pathological and toxicological effects of chronic ethanol consumption in humans, *Experimental and Toxicologic Pathology* (Epub, January 29).
49. Defeng W, Cederbaum AI (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health*, 27, 4, 277–284.
50. Das SK, Vasudevan DM (2005) Monitoring oxidative stress in patients with nonalcoholic and alcoholic liver diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20, 2, 24–28.
51. Kulkarni SR, Ravindra KP, Dhume CY, Rataboli P, Rodrigues E (2009) Levels of plasma testosterone, antioxidants and oxidative stress in alcoholic patients attending de-addiction centre. *Biology and Medicine*, 1, 4, 11–20.
52. Hartleb M, Czech E (2007) Alkoholowa choroba wątroby. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 2, 2, 92–100.
53. Pollak N, Dolle C, Ziegler M (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal*, 402, 205–218.

Adres do korespondencji:

Aleksandra Kołota

Zakład Fizjologii Żywienia

Katedra Dietetyki

Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

ul. Nowoursynowska 159c

02-766 Warszawa

tel. 22 593 70 29 lub 504 525 086

faks 22 593 70 31

e-mail: a.kolota@gmail.com

Otrzymano: 03.07.2012

Przyjęto do druku: 03.09.2012

